



Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijski odsjek

Bernardo Marcioš

**ODREĐIVANJE ELEMENTNIH PROFILA
PRIPRAVAKA LJEKOVITOG BILJA
SPEKTROMETRIJSKIM I
KEMOMETRIJSKIM METODAMA**

Diplomski rad

predložen Kemijskom odsjeku

Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

radi stjecanja akademskog zvanja

magistra kemije

Zagreb, 2017 godina.

Ovaj diplomski rad izrađen je u Zavodu za Analitičku kemiju Kemijskog odsjeka
Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom izv. prof. dr.
sc. Sande Rončević i neposrednim vodioštvom dipl. ing. kem. Ivana Nemeta.

Zahvale

Zahvaljujem se izv. prof. dr. sc. Sandi Rončević na predanom znanju i iskustvu, stručnim savjetima, strpljivosti te šansi da razvijam vještine kroz vrlo kvalitetan laboratorijski rad.

Posebne zahvale i neposrednom voditelju dipl. ing. kemije Ivanu Nemetu na savjetima, strpljenju, ugodnoj radnoj atmosferi i profesionalnom vodstvu kroz diplomski rad.

Sadržaj

SAŽETAK.....	VI
ABSTRACT	VII
§ 1. UVOD.....	1
§ 2. LITERATURNI PREGLED	2
2.1. Fitoterapija i fitofarmaceutski proizvodi.....	2
2.1.1. Biljni ekstrakti.....	2
2.1.2. Tinkture	2
2.1.3. Integralne suspenzije ljekovitog bilja.....	2
2.1.4. Standardizirani ekstrakti ljekovitih pripravaka	3
2.2. Regulatorna kakvoća pripravaka ljekovitog bilja u Europi	4
2.3. Atomska emisijska spektrometrija uz induktivno spregnutu plazmu	6
2.3.1. Spektrometrijski principi metode	7
2.3.2. Analitičke značajke metode	8
2.4. Kemometrijski postupci analize.....	10
§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO	11
3.1. Kemikalije.....	11
3.2. Instrumenti	11
3.3. Uzorci pripravaka ljekovitog bilja i priprema za elementnu analizu	12
3.3.1. Standardizirani ekstrakti ljekovitih biljaka (ekstrakti EPS).....	12
3.3.2. Tablete na biljnoj bazi (kruti pripravci).....	13
3.3.3. Certificirani referentni materijali (CRM)	13
3.4. Mjerni postupci	14
3.4.1. Parametri metode ICP-OES.....	14
3.4.2. Priprema kalibracijskih otopina	15
3.4.3. Kemometrijska obrada podataka	15
§ 4. REZULTATI I RASPRAVA	16
4.1. Preliminarna istraživanja.....	16
4.2. Kontrola točnosti.....	16
4.3. Mjerni rezultati elementnih profila pripravaka ljekovitog bilja	18
4.3.1. Grafički prikaz mjernih rezultata ekstrakata EPS	19
4.3.2. Grafički prikaz mjernih rezultata tableta na bazi guarane i rodiole	21
4.4. Kemometrijski rezultati.....	23

4.4.1. Univarijantna statistička analiza	23
4.4.2. Multivarijantna analiza (PCA)	24
§ 5. ZAKLJUČAK	26
§ 6. LITERATURNI IZVORI.....	27
§ 7. DODATAK	XV
§ 8. ŽIVOTOPIS	XVI



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Diplomski rad

SAŽETAK

ODREĐIVANJE ELEMENTNIH PROFILA PRIPRAVAKA LJEKOVITOG BILJA SPEKTROMETRIJSKIM I KEMOMETRIJSKIM METODAMA

Bernardo Marcioš

Određivanje esencijalnih, ne-esencijalnih i toksičnih elemenata u ljekovitom bilju i pripravcima ljekovitog bilja vrlo je važno u procjeni nutritivnih vrijednosti, bioraspoloživosti te predviđanju negativnih posljedica na zdravlje čovjeka i okoliš. Odnedavno se primjenjuje novi postupak pripreme suspenzija integralnih biljaka zvanih lisevacija tj. ekstrakcija u gradijentu etanola pri kriogenim uvjetima. Navedenim postupkom povećan je udio aktivnih prirodnih spojeva, no studije koje bi dale uvid u elementni sastav su nedostatne. Analitičke spektrometrijske metode temeljene na plazma izvoru omogućuju istodobno i precizno određivanje koncentracije metala u realnim uzorcima te uz različite kemometrijske metode omogućavaju interpretaciju elementnih profila koji su temelj prepoznavanja botaničkog i geografskog porijekla biljaka.

U ovom radu određeni su elementni sastav standardiziranih ekstrakata ljekovitog bilja te dodatka prehrani izvedenih iz ljekovitih biljaka *Echinacea purpurea*, *Curcuma longa*, *Rhodiola rosea* i *Paullinia cupana* metodom atomske emisijske spektrometrije uz induktivno spregnutu plazmu. Odabrane su emisijske linije koje nemaju značajne interferencije. Postignuta je vrlo dobra preciznost mjerenja ($RSD < 2\%$). Linearnost linija bila je u zadovoljavajućem rasponu vrijednosti koeficijenta korelacije ($R^2 0,9995$). Kontrola točnosti utvrđena je sa tri certificirana referentna materijala. Elementni profil uzoraka izveden je iz mjerenih podataka upotrebom kemometrijskih alata, tj. univarijatne i multivarijatne statističke analize. Određivanjem elementnog profila standardiziranih ekstrakata ljekovitog bilja i dodatka prehrani dobiven je uvid u sadržaj elemenata: Ba, B, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, K, Mn, Pb, Sr, V i Zn.

(42 stranice, 10 slika, 14 tablica, 31 literaturnih navoda, jezik izvornika: Hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Horvatovac 102a, Zagreb i Repozitoriju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Ključne riječi: elementni profil, ICP-OES, ljekoviti pripravci, metali, PCA

Mentor: izv. prof. dr. sc. Sanda Rončević

Neposredni voditelj: dipl. ing. kemije Ivan Nemet

Ocjenitelji:

1. izv. prof. dr. sc. Sanda Rončević
2. izv. prof. dr. sc. Biserka Prugovečki
3. doc. dr. sc. Ivan Kodrin

Zamjena: izv. prof. dr. sc. Iva Juranović Cindrić

Datum diplomskog ispita: 21. rujan, 2017



University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Diploma Thesis

ABSTRACT

DETERMINATION OF ELEMENTAL PROFILE OF HERBAL DRUGS USING SPECTROMETRIC AND CHEMOMETRIC METHODS

Bernardo Marcijuš

Determination of essential, non-essential and toxic elements in medicinal plants and herbal extracts is of great importance in evaluation of nutritional value and bioavailability, and in predicting the negative consequences on human health and on the environment. Lixiviation, a new procedure for preparation of medicinal herb suspension has been applied recently; i.e. extraction in ethanol gradient under cryogenic conditions. This procedure increased the amount of active natural compounds, but studies that would give insight into the elemental composition are insufficient. Analytical spectrometric method based on plasma source provide precise and simultaneous determination of metal concentrations in real samples. Processing of obtained data with chemometric methods allow interpretation of elemental profiles, which are generally, the fundamental in recognizing botanical and geographical origin.

In this study, elemental profile of standardized herbal extracts and dietary supplements derived from herbal plants *Echinacea purpurea*, *Curcuma longa*, *Rhodiola rosea* i *Paullinia cupana* was determined using inductively coupled plasma optical emission spectrometry. Emission lines that had no significant interferences were selected. Satisfying analytical precision was achieved. Accuracy of applied analytical procedures and samples was established in comparison with three certified reference materials. The elemental profile of the samples was derived from measured data sets using chemometric tools, univariate and multivariate statistical analysis. Elemental profiling of standardized herbal extracts and dietary supplements provided insight into elemental content of essential and trace elements.

(42 pages, 10 figures, 14 tables, 31 references, original in Croatian)

Thesis deposited in Central Chemical Library, Faculty of Science, University of Zagreb, Horvatovac 102a, Zagreb, Croatia and in Repository of the Faculty of Science, University of Zagreb

Keywords: elemental profile, herbal extracts, ICP-OES, metals, PCA

Mentor: assoc. prof. dr. sc. Sanda Rončević

Assistant mentor: dipl. ing. chem. Ivan Nemet

Reviewers:

1. assoc. prof. dr. sc. Sanda Rončević
 2. assoc. prof. dr. sc. Biserka Prugovečki
 3. asst. prof. dr. sc. Ivan Kodrin
- Substitute: assoc. prof. dr. sc. Iva Juranović Cindrić

Date of exam: 21. september, 2017

§ 1. UVOD

Sadržaj esencijalnih, neesencijalnih te toksičnih elemenata u ljekovitom bilju i različitim pripravcima ljekovitog bilja vrlo je važan kako u procjeni nutritivnih vrijednosti i bioraspoloživosti tako i u predviđanju negativnih posljedica na okoliš i zdravlje.^{1,2} Određivanje elementnog „otiska prsta“ (engl. *fingerprint*) navedenih uzoraka postiže se temeljnim spektrometrijskim tehnikama s plazma izvorima. Analizom se dobivaju kompleksni skupovi podataka o mjerenim koncentracijama elemenata koji se zatim obrađuju kemometrijskim principima. Time je omogućena interpretacija elementnih profila koji su temelj prepoznavanje botaničkog i geografskog porijekla.³

Odnedavno se primjenjuje novi postupak pripreme suspenzija integralnih biljaka zvani liksivijacija tj. ekstrakcija u gradijentu udjela etanola pri kriogenim uvjetima. Utvrđeno je da je navedenim postupkom povećan udio aktivnih prirodnih spojeva kao što su polifenoli, flavonoidi i triterpenske kiseline u navedenim suspenzijama, no studije koje daju uvid u elementni sastav su nedostatne.

U ovom radu određeni je elementi sastav standardiziranih ekstrakata ljekovitog bilja (fr. *extraits de plantes fraîches standardisées*, EPS) te dodataka prehrani izvedenih iz ljekovitih biljaka *Echinacea purpurea*, *Curcuma longa*, *Rhodiola rosea* i *Paullinia cupana* metodom atomske emisijske spektrometrije uz induktivno spregnutu plazmu (engl. *inductively coupled plasma optical emission spectrometry*, ICP-OES).

Metodom ICP-OES utvrđen je sadržaj elemenata visoke, srednje i niske koncentracije u sastavu EPS ekstrakata. Dobiveni rezultati su podvrgnuti kemometrijskim postupcima, univarijantnoj i multivarijantnoj analizi, zajedno sa literaturnim vrijednostima koncentracija elemenata u biljkama kako bi se definirale zajedničke karakteristike i/ili značajne razlike. Cilj je omogućiti detaljniji uvid u elementni profil uzoraka biljnih lijekova i dodataka prehrani te pomoći u razvoju metoda kontrole kakvoće sličnih proizvoda.

§ 2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Fitoterapija i fitofarmaceutski proizvodi

Fitoterapija je medicinska disciplina koja kao izvor ljekovitih biološki aktivnih tvari koje utječu na ljudski organizam koristi bilje. Aktivne tvari imaju ulogu očuvanja i održavanja zdravlja, prevencije i liječenja bolesti. U modernoj definiciji fitoterapija koristi bilje i biljne ekstrakte koje imaju veliku terapijsku širinu (slabo toksične biljke), no ne postoje usklađene norme kolika bi ta širina trebala biti.⁴

2.1.1. Biljni ekstrakti

Ekstrakcija je proces ukoncentriravanja biološki aktivnih tvari i razdvajanja od onih koje smatramo manje bitnim za aktivno djelovanje. Dije se prema adekvatnosti za uporabu, prema tipu otapala koja se koriste i prema postupku ekstrakcije. Svi ekstrakti imaju zajedničku karakteristiku. Biljke se podvrgnu kontaktu sa odabranim ekstrakcijskim sredstvom u kojem se otapaju željene aktivne tvari. Ekstrakti koji su odmah pogodni za korištenje nakon pripreme su infuzi, dekoti, tinkture, glicerolni ekstrakti, SIPF (fr. suspension intégrale des plantes fraîches, SIPF i EPS ekstrakti.⁵

2.1.2. Tinkture

Tinktura je fitofarmaceutski proizvod (ekstrakt) gdje se kao ekstrakcijsko sredstvo koristi alkohol (etanol). Princip pripreme je potapanje točno određene količine biljne droge u točno definiranu količinu alkohola specifičnog postotka. Prednost korištenja alkohola pred vodom je što se u alkoholu može otopiti veća količina farmakološki aktivnih tvari. Nedostatak tinktura je selektivna ekstrakcija tvari. Odabire se fiksni volumni postotak etanola u kojem se neke tvari tope bolje, a neke slabije. Problem je riješen sa SIPF i EPS tehnologijom.⁶

2.1.3. Integralne suspenzije ljekovitog bilja

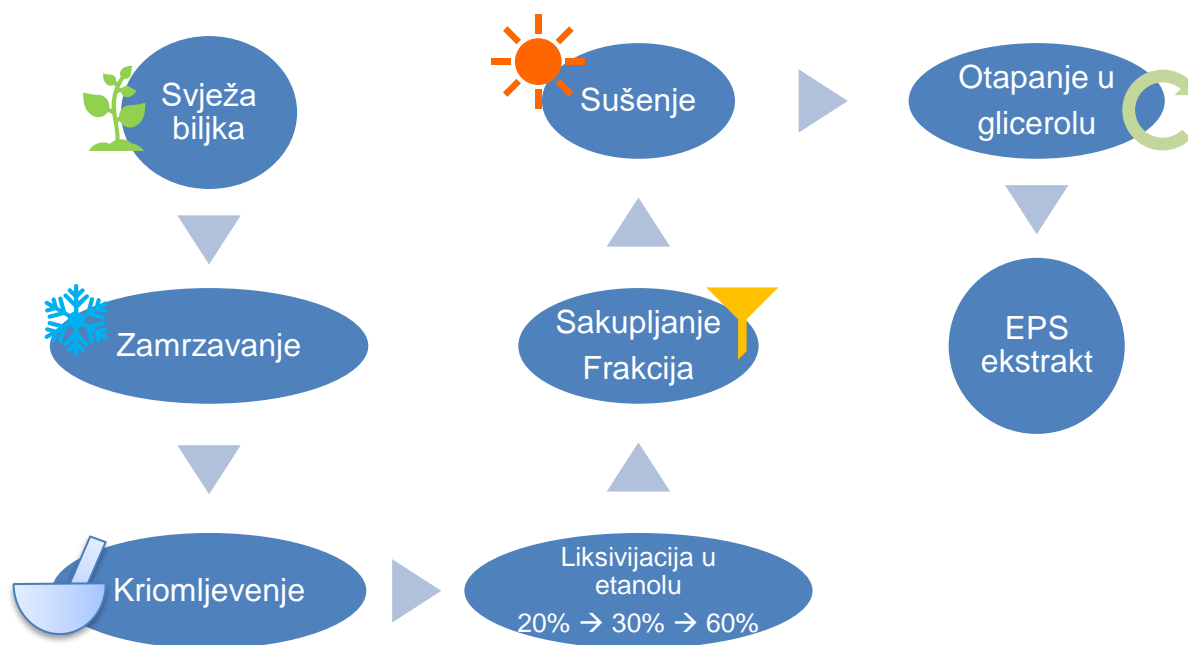
Priprema integralnih suspenzija ljekovitog bilja je prvi uspješni tehnološki postupak gdje se u jednom ekstraktu dobiva raznoliki „buket“ aktivnih spojeva koji se nemože dobiti u prethodno spomenutim tinkturama gdje se koristi alkohol samo jednog volumnog postotka. Biljni materijal se sačuva dubokim zamrzavanjem, potom slijedi kriokonserviranje i na kraju ekstrakcija 30 % volumnim etanolom. Nakon maceriranja u etanolu slijedi centrifugiranje u svrhu odvajanja supernatanta. Nastali talog se preša u ultramolekularnoj preši kojom se cijedi svježi sok biljke i zaostali ekstrakt te se spaja sa supernatantom.

Ovim principom ekstrakcije sačuvan je svježiji sok biljke s aktivnim tvarima koje se nisu macerirale u etanolu dok se istovremeno u pripravak ekstrahiraju tvari koje su inače slabo topive u vodi. Ekstrakti SIPF sadrže manje etanola od klasičnih tinktura.

Nedostatak ekstrakata SIPF je prisustvo etanola koji može biti štetan za neke ljude. Također, do optimalna ekstrakcija tvari dolazi samo u etanolu većeg volumnog postotka te nema standardizacije na karakteristične aktivne tvari.⁷

2.1.4. Standardizirani ekstrakti ljekovitih pripravaka

Standardizirani ekstrakti ljekovitih su najnovija generacija biljnih ekstrakata kojima se pokušava izvući maksimum iz ljekovitih tvari. Ovi ekstrakti se dobivaju postupkom liksivijacije odnosno progresivnim iscrpljivanjem aktivnih tvari u rastućim koncentracijama etanola. Proces pripreme je jednak kao i kod ekstrakata SIPF sve do koraka ekstrakcije. Samljeveni biljni materijal se ekstrahira u rastućim koncentracijama etanola (20 % - 70 % vol. etanol) što omogućuje potpunu ekstrakciju ljekovitih tvari. Kao primjer možemo uzeti glog gdje su oligomerni procijanidini topivi u 30 %, flavonoidi u 45 %, a triterpenske kiseline u 70 % etanolu ili ehinaceju gdje se polisaharidi ekstrahiraju u 20 %, cikorična kiselina u 30 % i alkilamidi u 50 % etanolu. Cijeli proces ekstrakcije prikazuje **Slika 1.**



Slika 1. Shema postupka ekstrakcije

Kako aktivne tvari nebi bile previše razrijeđene vrši se uklanjanje otapala u vakumu te nastaje suhi koncentrirani ekstrakt. Na kraju slijedi standardizacija suhog ekstrakta na karakteristične aktivne tvari te priprema tekućeg ili krutog ljekovitog oblika.

Tekući oralni oblici se dobivaju otapanjem u 80 % glicerolu te nastaje pripravak sličan sirupu. Glicerol je poptuno neškodljiv alkohol za razliku od etanola te je sam po sebi konzervans kada je koncentriran i slatkog je okusa, što dodatno olakšava konzumaciju. Svaki pripravak dolazi sa certifikatom koji sadrži podatke o mikrobiološkoj čistoći.

Suhi oralni oblici dolaze u dva oblika, kao tablete koje kombiniraju sinergističko djelovanje dviju biljaka te kao kapsule koje sadrže ekstrakt jedne biljke.⁸

2.2. Regulativa kakvoće pripravaka ljekovitog bilja u Europi

Pripravci ljekovitog bilja su prvi puta spomenuti 1986. godine na međunarodnoj konferenciji za regulativu lijekova (engl. *International Conference on Drug Regulatory Authorities*, IDCRA).⁹ Godine 1991. Svjetska zdravstvena organizacija (engl. *World Health Organization*, WHO) dala je smjernice za procjenu pripravaka ljekovitog bilja koje su prihvaćene na 6. međunarodnoj konferenciji za regulativu lijekova (IDCRA). Smjernice su sadržavale kriterije za kvalitetu, sigurnost i efikasnost pripravaka ljekovitog bilja. Nakon smjernica, WHO je izdala i razne farmaceutske monografije o pripravcima ljekovitog bilja.¹⁰

Svaka država ima vlastite zakone i regulativu za pripravke ljekovitog bilja temeljene na tradiciji te etnološkoj i medicinskoj povijesti.¹¹ Svjetska zdravstvena organizacija je predložila da bi svaka država trebala prihvatiti opće regulative vezane za pripravke ljekovitog bilja kako bi se jednostavnije mogla definirati njihova kvaliteta, sigurnost primjene i efikasnost. Osim WHO, protokole o sigurnosti, efikasnosti, standardizaciji i dokumentiranju ljekovitog bilja i pripravaka ljekovitog bilja dala je i Međunarodna unija za čistu i primjenjenu kemiju (engl. *International union of pure and applied chemistry*, IUPAC). Postoje i uže specijalizirane agencije kao Američka agencija a za hranu i lijekove (engl. *Food & Drug Administration*, FDA) koja je definirala lijek kao proizvod koji liječi, ublažava ili sprječava bolest. Kako bi biljna droga bila definirana kao takav proizvod mora proći iste postupke provjere kao i sintetski lijek. Europska zajednica za čajeve i biljne infuze (engl. *Tea & Herbal Infusion Europe*, THIE) ima zadatak uspostavljanja Europske politike i pravila vezanih uz čajeve i biljne infuze.

Godine 2004. osnovan je odbor za medicinske pripravke ljekovitog bilja (engl. *The Committee on Herbal Medicinal Products*, HMPC) prema regulativi (EC) No 726/2004 i direktivi 2004/24/EC koji je pojednostavio procedure registracije tradicionalnih pripravaka ljekovitog bilja. Cilj je bio uskladiti procedure i odredbe između država članica Europske unije i integrirati pripravke ljekovitog bilja unutar zakonskih okvira Europe. Organizacija HMPC evaluira sve dostupne informacije (kliničke i nekliničke) i dokumentira rezultate. Sastoji se od znanstvenih stručnjaka koji se bave pripravcima ljekovitog bilja, suradnika iz Europske uprave za kvalitetu medicine (engl. *European Directorate for the Quality of Medicine*, EDQM) te stručnjaka iz Albanije, Bosne i Hercegovine, Kosova pod UNSC odlukom 1244/99 i Makedonije, Crne gore, Srbije i Turske kao dio EU programa.

Većina individualnih pripravaka je licencirana od strane članica Europske unije i cijeli proces samog licenciranja i davanja informacije je usklađen kroz cijelu Europsku uniju.¹⁰

Hrvatska kao članica Europske unije mora se pridržavati propisa unutar Europske farmakopeje koja diktira zahtjeve za kvalitetu biljnih droga i pripravaka ljekovitog bilja. Dopuštene količine metala propisane prema WHO i Europskoj farmakopeji u pripravcima ljekovitih bilja prikazane su u **Tablici 1.**¹⁴

Tablica 1. Dopuštene količine metala propisane od strane WHO, FDA i Europske farmakopeje

Element	Dopuštene granice prema WHO/FDA	Dopuštene granice prema Ph.Eur.	Preporučena dnevna doza (u mg)	Privremeno dopuštena tjedna doza prema WHO (mg kg ⁻¹)
Al	-	-	-	-
As	10	-	-	15
Br	-	-	1.5 - 2.5	-
Cd	0.3	0.5	-	7
Co	-	-	-	-
Cr	-	-	0.02 – 0.2	-
Cu	-	-	1.0 – 3.0	-
Fe	-	-	10 – 18	-
Hg	1	0.1	-	5
Mn	-	-	1.0 – 5.0	-
Ni	-	-	0.13 – 0.4	-
Pb	10	5	-	25
Se	-	-	0.02 – 0.2	-
V	-	-	0.1 – 0.4	-
Zn	-	-	15	-

Također, donosi i vrlo precizne upute i definira načine izvođenja analitičkih tehnika kojima se potvrđuje kvaliteta proizvoda.

Većina pripravaka na biljnoj bazi i suhih biljnih pripravaka u Hrvatskoj ne zadovoljava u potpunosti sve norme propisane Europskom farmakopejom. Problem je što se ne analizira svaka serija ljekovitog bilja i ne provode se sve analize koje su definirane zahtjevima i normama. Često se samo naprave mikrobiološke analize, bez onih koje zahtijeva farmakopeja kao količina toksičnih teških metala (As, Hg, Pb, Cr i Cd) koji mogu biti vrlo štetni za dojenčad i trudnice jer oštećuju središnji živčani sustav, bubrege, gastro-intestinalni trakt te reproduktivni sustav i zglobove te metala u tragovima (Mn, Fe, Co, Cu, V, Zn, Mo). Kao glavni razlog tome se navodi to što je većina biljaka kod nas registrirana kao hrana ili dodatak prehrani te se ne zahtijeva analiza svake serije biljaka niti su zahtjevi jednaki kao farmakopejske norme za pripravke ljekovitog bilja.^{12,13} Problem je i to što WHO još nije odlučila koje su dopuštene granice za sve metale u pripravcima ljekovitog bilja iz razloga jer su neki elementi bitni mikronutrijenti za ljude.¹⁴

2.3. Atomska emisijska spektrometrija uz induktivno spregnutu plazmu

Atomska emisijska spektrometrija uz induktivno spregnutu plazmu (engl. *Inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy*, ICP-OES) pripada metodama analitičke spektrometrije gdje se informacija o kemijskom sastavu uzoraka dobije iz atomskih spektara u optičkom dijelu elektromagnetskog zračenja (emz). Atomski spektri su posljedica pojave kojom pobuđeni elektroni u atomima emitiraju zračenje karakteristične valne duljine pri povratku u osnovno stanje. Atomska spektrometrija kao metoda prvenstveno ima ulogu u kvantitativnoj analizi određivanja sadržaja elemenata u uzorcima gdje kvantitativne informacije analita proizlaze iz intenziteta emisije elektromagnetskog zračenja.¹⁵

Temeljni procesi na kojima počiva ICP-OES metoda mogu se promatrati kroz 3 koraka: stvaranju slobodnih atoma i/ili iona tj. atomizaciji uzorka, pobuđivanju i emisiji. Atomizacija se postiže visokotemperaturnim izvorom zvanim plazma koji ima ulogu i u pobuđivanju vanjskih elektrona.¹⁶

Plazma je vodljiva plinska smjesa koja sadrži znantnu količinu elektrona i pozitivnih iona te promatrana u malim dimenzijama je električni neutralna. Najčešće se generira ionizacijom inertnih plinova kao što su argon ili helij. U spektrokemijskoj instrumentaciji za emisijske analize najčešće se primjenjuje argonova plazma gdje su ioni argona i elektroni osnovne vodljive vrste, iako vodljivosti pridonose i kationi analita.

Ioni argona, jedanput stvoreni u plazmi, sposobni su za apsorpciju dovoljne snage iz vanjskog izvora, koja održava temperaturu na stupnju koji ima kapacitet pobuditi i ionizirati većinu elemenata periodnog sustava pri čemu ne dolazi do formiranja stabilnih čestica argona s analitom te se emitira jednostavan spektar. Ovisno o načinu nastajanja plazme govorimo o induktivno spregnutoj plazmi (ICP) čije prednosti su osjetljivost i manji broj interferencija, te istosmjernom izvoru plazme (DCP) koji je jednostavniji i jeftiniji.¹⁷

2.3.1. Spektrometrijski principi metode

Spektrometrijske tehnike koje posjeduju emisijski izvor plazmu temelje se na činjenici da pobuđeni elektroni atoma i jednoatomnih iona pri povratku u osnovno stanje emitiraju zračenje karakteristične valne duljine. Kada se vanjski elektroni nalaze u orbitalama koje su najbliže jezgri tada se atom nalazi u stanju najniže energije tj. osnovnom stanju. Apsorpcijom elektromagnetskog zračenja energija atoma poraste te atom prelazi u jedno od pobuđenih stanja. Taj proces se naziva ekscitacija. S obzirom da je novonastalo stanje nestabilno, atom će se relaksirati u osnovno stanje na način da emitira foton elektromagnetskog zračenja. Pri dovoljno visokoj energiji, elektron može u potpunosti napustiti atom i uzrokovati ionizaciju. Energija potrebna za navedeni proces odgovara ionizacijskom potencijalu i različita je za svaki pojedini element.

Svaki kemijski element ima specifične skupove energijskih nivoa pa prema tome i jedinstveni skup emisijskih linija. Brojnost linija u plazma izvoru je vrlo visoka, postoji čak 200 000 linija elemenata u području od 200 do 400 nm. Primjerice, krom (Cr) posjeduje 3000 linija, željezo (Fe) 4400 te molibden (Mo) 3400 linija.

Kod kvantitativne primjene ICP-OES metode mjeri se intenzitet zračenja pojedine linije za svaki element. Intenzitet je direktno proporcionalan energiji na određenoj frekvenciji u jedinici vremena te jednak broju atoma koji u jedinici volumena i vremena emitiraju karakterističnu liniju zračenja:

$$I = A_{ij} \times N_i \times h\nu \quad (1)$$

I – intenzitet, A_{ij} – vjerojatnost prijelaza između pobuđenog i osnovnog stanja, N_i – broj atoma u pobuđenom stanju, h – Planckova konstanta ($h = 6,626 \times 10^{-34} \text{Js}$), ν – frekvencija zračenja

Odnos atoma u osnovom i pobuđenom stanju kada se sustav nalazi u ravnoteži opisuje Boltzmannov zakon:

$$\frac{N_i}{N_j} = \frac{g_i}{g_j} e^{-\frac{E_i - E_j}{kT}} \quad (2)$$

N_j – broj atoma u osnovnom stanju, g_i, g_j – statističke težine pobuđenog i osnovnog stanja, k – Boltzmanova konstanta ($k = 1,38 \times 10^{-23} \text{ J K}^{-1}$), T – apsolutna temperatura, E_i – energija pobuđenog stanja, E_j – energija osnovnog stanja

Iz jednadžbi (1) i (2) može se definirati apsolutni intenzitet emisije:

$$I = A_{ij} \times h\nu \times N \times \frac{g_i}{g_j} \times e^{-\frac{E_i}{kT}} \quad (3)$$

Broj čestica u pobuđenom stanju (N) unutar izvora odnosi se na različite čestice istog elementa, a njihov nastanak je uvjetovan energijom disocijacije raznih molekulskih vrsta i energijama ionizacije. Poveznica između ukupne koncentracije čestica i koncentracije elemenata može se povući preko vrlo kompleksnih jednadžbi koje uključuju procese isparavanja, disocijacije i transporta unutar plazme. S obzirom da se odnosi intenziteta i koncentracije u plazmi ne mogu izračunati s dovoljnom točnošću, najčešće se koristi empirijski utvrđen odnos između koncentracije analita i intenziteta emisije analita u uzorku preko kalibracijske krivulje. Iz tog razloga ICP-OES metoda nije apsolutna metoda kvantitativnog određivanja nego relativna. Intenzitet spektralne linije u praktičnoj primjeni se vrlo često naziva „signal linije“.¹⁸

2.3.2. Analitičke značajke metode

Detekcijske granice

Detekcijske granice (c_L) ovise o tipu plazma izvora, raspršivača, spektrometra te vrsti analita. Pri određivanju velikog broja elemenata detekcijske granice su u području $\mu\text{g L}^{-1}$. Određene su osjetljivošću mjerenja i količini šuma (pozadinske buke). Za grubu kvantitativnu analizu preporučena je koncentracija elemenata barem 5 puta veća od same detekcijske granice, dok točna mjerenja zahtijevaju čak 100 puta veću koncentraciju. Neki elementi imaju prenisku detekcijsku granicu i ne mogu se odrediti pri niskim koncentracijama. Takvi elementi se podvrgnu postupku ukoncentriravanja.

Preciznost i točnost

Preciznost opisuje slaganje između dvaju ili više mjerenja izvedenih na potpuno isti način. Za koncentracije analita koje su 100 puta veće od detekcijske granice, preciznost mjerenja koja je izražena kroz relativnu standardnu devijaciju iznosi između 0,1 – 2,0%.

Točnost opisuje bliskost rezultata mjerenja i njegove istinske prihvaćene vrijednosti, a izražava se kao pogreška. Točnost mjeri slaganje između rezultata i prave vrijednosti. U najvećoj mjeri ovisi o sličnosti kalibracijskih otopina i otopina analita. Kod otopina čiji sastav značajno varira postiže se točnost oko 10%.

Interferencije

Kemijske interferencije su rezultat interakcija između određivanih i prisutnih elemenata u analitu. Većina kemijskih interferencija je eliminirana zbog visoke temperature plazme (10 000 K), no mogu se ukloniti i dodatkom raznih reagensa koji vežu interferirajuće sastojke.

Fizikalne interferencije su usko povezane s promjenom fizičkih svojstava analita, a mogu se smanjit izborom pravog raspršivača, korištenjem peristaltičke pumpe, razrjeđenjem otopina te korištenjem unutarnjeg standarda.

Spektralne interferencije su one koje uzrokuju najveće pogreške prilikom mjerenja, a odnose se na ukupno zračenje koje pada na detektor. Mogu se smanjiti odabirom pogodnih emisijskih linija za svaki element, većom rezolucijom spektrometra te korekcijom pozadinskog šuma.

Memorijske interferencije se javljaju kod mjerenja različitih uzoraka kada dolazi do pojačanja signala zbog analita koji je prethodno mjeren. Smanjuje se ispiranjem sa slijepom probom prije svakog slijedećeg uzorka.

Multielementna analiza i dinamičko područje

Najveća prednost metode ICP-OES je mogućnost brze kvantitativne multielementne analize. Metodu karakterizira robusnost, preciznost, ponovljivost te simultano određivanje velikog broja elemenata. Nudi i široki dinamički raspon od 4-6 redova veličine koji obuhvaća elemente u tragovima i glavne elemente u uzorku.¹⁹⁻²¹

2.4. Kemometrijski postupci analize

Brzi razvoj prirodnih znanosti doveo je do potrebe za proučavanjem, praćenjem i kontroliranjem sve većeg broja raznih svojstava (kemijskih, fizičkih, morfoloških, itd.). Zbog takvog progresivnog nagomilavanja podataka koji su u kompleksnim odnosima potrebno je koristiti statističke modele i postupke kako bi se dobila cjelovita slika o samoj povezanosti. Kada se navedene statističke metode koriste u kemiji nazivaju se kemometrijski postupci. Metode koje se bave analizom višestrukih izmjera većeg broja varijabli na jednom ili više uzoraka nazivaju se multivarijantne metode te omogućuju proučavanje relacija, upotrebljivosti i značajnosti brojnih zavisnih ili nezavisnih varijabli. U multielementnoj analizi uzorka najzastupljenije su metoda glavnih komponenata (engl. *Principal Component Analysis*, PCA), klsterska analiza (engl. *Cluster Analysis*, CA) i korelacijska analiza.

Svrha PCA metode je analiza linearne povezanosti većeg broja varijabli u svrhu smanjenja količine podataka no uz uvjet da između njih postoji korelacija. Pomaže utvrditi razlike između uzoraka i navodi koje varijable doprinose toj razlici te omogućuje identifikaciju skupine varijabli koje su povezane pojavama koje se ne mogu direktno promatrati.

Svrha CA analize je grupiranje grupa predmeta u klase tako da se slični predmeti nalaze unutar iste klase. Uz uvjete da svaka grupa mora biti homogena s obzirom na određene varijable tj. da su svi opažaji u jednoj grupi slični jedni drugima i da svaka grupa mora biti različita od druge s obzirom na te iste varijable, tj. da opažanja u jednoj grupi moraju biti drugačija od opažanja u drugoj grupi.^{22,23}

Aktualna istraživanja ukazuju na veliki značaj primjene kemometrijskih alata u analizi ljekovitog bilja, pripravaka na bazi ljekovitog bilja i tla. Kao primjer može se uzeti analiza kemijskog sastava sedam vrsta biljaka u svrhu određivanja da li se biljke iste vrste iz različitih dijelova Europe se značajno razlikuju u elementnom sastavu²⁴; određivanje elementnog profila i efikasnosti ekstrakcije pri izradi infuza ljekovitog bilja²⁵; forenzička komparativna analizi tla koristeći „otisak prsta“ elementnog sastava tla sa različitih područja.²⁶

§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Kemikalije

Kemikalije korištene u eksperimentalnom radu:

- Destilirana deionizirana voda, Mili-Q Element 18 system, (Milipore, USA)
- Vodikov peroksid, H_2O_2 konc. 30 % (Kemika, Zagreb, Croatia)
- Dušična kiselina, HNO_3 *pro analysis* 70 % (Kemika, Zagreb)
- Dušična kiselina, HNO_3 *Spectrapure* 70 % (Merck, Darmstadt, Germany)
- Jednoelementna standardna otopina (Mn) (Plasma Pure, Leeman Labs, Hudson, NH, USA)
- Multielementna standardna otopina (Al, As, B, Ba, Be, Bi, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, K, Li, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, Pb, Se, Sr, Ti, Tl, V, Zn) 100 mg L⁻¹ u 5 % HNO_3 , ICP-Mehrelement-Standardlösung IV (Merck, Darmstadt, Germany)

Certificirani referentni materijali korišteni u eksperimentalnom radu:

- SRM IAEA-359 (eng. *Cabbage*), uzorak kupusa, Standard reference material, International Atomic Energy Agency
- SRM 1567a (eng. *Wheat flour*), uzorak pšeničnog brašna, Standard reference material, National Institute of Standards & Technology
- SRM 1570a (eng. *Spinach Leaves*), uzorak listova špinata, Standard reference material, National Institute of standards & Technology

3.2. Instrumenti

- Mikrovalna pećnica za digestiju uzoraka, *MWS-2 Microwave System Speedware* (Berghof, Eningen, Germany)
- Optički plazma spektrometar, *Prodigy High Dispersion ICP-OES* (Teledyne Leeman Labs., Hudson, NH, USA)

3.3. Uzorci pripravaka ljekovitog bilja i priprema za elementnu analizu

Organoleptička i makroskopska svojstva pripravaka ljekovitog bilja na bazi rodiole, kurkume, ehinaceje i guarane određena od strane proizvođača dana su u **Tablici 2.**

Tablica 2. Organoleptička i makroskopska svojstva analiziranih pripravaka ljekovitog bilja

Uzorci	Vrsta pripravka	Miris	Boja	Okus
EPS ekstrakt rodiole	Tekući sirup (glicerolni)	Ruža	Narančasta do smeđa	Ljut
EPS ekstrakt kurkume	Tekući sirup (glicerolni)	Karakterističan	Smeđe narančasta	Ljut
EPS ekstrakt ehinaceje	Tekući sirup (glicerolni)	Slabog mirisa	Smeđa do tamno smeđa	Ljut i gorak
Dodatak prehrani na bazi guarane i rodiole	Tableta	-	Bijela	Gorak

3.3.1. Standardizirani ekstrakti ljekovitih biljaka (ekstrakti EPS)

Pipetirano je 0,5 mL standardiziranog ekstrakta ljekovitog bilja u male čaše uz odvagu mase. Analitičke odvage pojedinih uzoraka prikazane su u **Tablici 3.** Uzorci su zatim preneseni u teflonske posude uz dodatak 7 mL konc. 70 % dušične kiseline te je sustav podvrgnut mokroj razgradnji potpomognutoj mikrovalnim zračenjem u zatvorenom sustavu uređaja MWS-2 Microwave System Speedware (Berghof, Eningen, Germany).

Tablica 3. Analitičke odvage biljnih EPS ekstrakata

Uzorci	Mase (mg)
Rodiola	603,14
Kurkuma	614,58
Ehinaceja	615,97

Mikrovalna razgradnja uzorka provedena je u tri koraka prema programu navedenom u **Tablici 4.** Nakon razgradnje u teflonske boce dodano je 2 mL 30 % vodikova peroksida te se ostavilo stajati preko noći. Dobivene bistre otopine prenesene su u odmjerne tikvice od 25 mL i razrijeđene do oznake destiliranom deioniziranom vodom (Mili-Q).

Tablica 4. Program mokre razgradnje EPS ekstrakata

Korak	Temperatura (°C)	Snaga (%)	Vrijeme (min)
I.	110	40	10
II.	150	50	20
III.	150	40	15

3.3.2. Tablete na biljnoj bazi (kruti pripravci)

Uzorak tablete na bazi guarane i rodiole usitnjen je u ahatnom tarioniku do praha. Analitička odvaga uzorka od 350 mg prebačena je u teflonsku posudu uz dodatak 7 mL konc. 70 % dušične kiseline te je sustav podvrgnut mokroj razgradnji potpomognutoj mikrovalnim zračenjem u zatvorenom sustavu uređaja MWS-2 Microwave System Speedware (Berghof, Eningen, Germany).

Mikrovalna razgradnja uzorka provedena je u tri koraka prema programu navedenom u tablici **Tablici 5**. Nakon razgradnje u teflonske boce dodano je 2 mL 30 % vodikova peroksida te se ostavilo stajati preko noći. Dobivene razrijeđene otopine prenesene su u odmjerne tikvice od 25 mL i razrijeđene do oznake destiliranom vodom (Mili-Q)

Tablica 5. Program mokre razgradnje tableta

Korak	Temperatura (°C)	Snaga (%)	Vrijeme (min)
I.	110	40	10
II.	130	50	15
III.	160	60	15

3.3.3. Certificirani referentni materijali (CRM)

U svrhu potvrđivanja točnosti analitičkog postupka, korišteni su referentni materijali biljaka (IAEA 359-*Cabbage*, NIST SRM-1567a *Wheat Flour* i NIST SRM-1570a *Spinach Leaves*). Referentni materijali su odabarani na temelju sličnosti sa elementnim sastavom uzorka. Analitičke odvage CRM-a prikazane su u **Tablici 6**.

Tablica 6. Analitičke odvage certificiranog referentnog materijala

CRM	Mase (mg)
IAEA-359 <i>Cabbage</i>	200,12
NIST SRM-1567a <i>Wheat Flour</i>	200,80
NIST SRM-1570a <i>Spinach Leaves</i>	200,58

Prije mikrovalne razgradnje u CRM uzorak kupusa (*IAEA-359 Cabbage*) dodano je 25 μL multielementnog standarda (engl. *spiking*). Mikrovalna razgradnja uzorka provedena je u 3 koraka prema programu navedenom u tablici **Tablici 7**. Nakon razgradnje u teflonske boce dodano je 2 mL 30 % vodikova peroksida te se ostavilo stajati preko noći. Dobivene razrijeđene otopine prenesene su u odmjerne tikvice od 25 mL i razrijeđene do oznake destiliranom vodom (Mili-Q).

Tablica 7. Program mokre razgradnje CRM-a

Korak	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Snaga (%)	Vrijeme (min)
I.	100	40	15
II.	140	40	15
III.	130	40	15

3.4. Mjerni postupci

3.4.1. Parametri metode ICP-OES

U svrhu multielementne analize priprava ljeovitog bilja i certificiranih referentnih materijala korišten je optički emisijski spektrometar Prodigy High Dispersion ICP (Teledyne Leeman Labs., Hudson, NH, USA.). Radni parametri instrumenta navedeni su u **Tablici 8**. Vrijeme integracije postavljeno je na 2s. Snimanje u oba položaja plamenika (aksijalni i radijalni) ponavljana su tri puta za svaku otopinu.

Tablica 8. Radni parametri instrumenta ICP-OES

Spektrometar	Ešlejni spektrometar visoke rezolucije L-PAD detektor
Raspršivač	Pneumatski (stakleni)
Komora za raspršivanje	Ciklonska (stakleni)
Položaj snimanja	Aksijalni, Radijalni
RF generator	40 MHz
Snaga generatora	1,3 kW
Protok Argona	Glavni: 18 L min ⁻¹ Pomoćni: 0.8 L min ⁻¹ Raspršivanje: 1 L min ⁻¹
Peristaltička pumpa	0,9 ml min ⁻¹
Odgoda unosa uzorka	20 s

3.4.2. Priprema kalibracijskih otopina

Jednoelementna standardna otopina Mn konc. 10 mg L^{-1} (Plasma Pure, Leeman Labs., Hudson, NH, USA) korištena je za pozicioniranje plazme u instrumentu te multielementna standardna otopina ICP-Mehrelement-Standardlösung IV (Merck, Darmstadt, Germany) za pripremu kalibracijskih otopina. Iz osnovne multielementne standardne otopine konc. 1000 mg L^{-1} napravljene su otopine za kalibraciju u konc. rasponu od 0,1 do 10 mg L^{-1} u tikvicama volumena 10 ml. Sve navedene otopine su razrijeđene s 2 % dušičnom kiselinom do oznake.

3.4.3. Kemometrijska obrada podataka

Podaci dobiveni elementnom analizom metodom ICP-OES pripravaka ljekovitog biljaka podvrgnuti su statističkoj analizi (univarijantnoj i multivarijantnoj) u svrhu provjere sličnosti ili različitosti između uzoraka. Korištene su metode distribucijske analize dijagrama s pravokutnikom (engl. *box-whiskers*) i analiza glavnih komponentata (PCA) u programu Microsoft Excel 2016 s programskim dodatkom XLStat i program Statistica 12.0.

§ 4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Preliminarna istraživanja

Odabrane su emisijske linije koje nemaju značajne spektralne interferencije i daju kvalitetan emisijski signal. Linearnost svih emisijskih linija bila je u zadovoljavajućem rasponu vrijednosti koeficijenta korelacije (R^2). Preciznost mjerenja postignuta je u rasponu od 0,1 do 2,5 % RSD. Određene su i detekcijske granice (engl. *Limits of detection*, LOD) metode. Svi podaci se nalaze u **Tablici 9**.

Tablica 9. Emisijske linije elemenata, vrijednosti koeficijenata korelacije za kalibraciju, detekcijske granice (LOD)

Element	λ / nm	Koeficijent korelacije (R^2)	LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)
Ba	455.403	0.9998	7.22
B	249.677	0.9997	7.00
Ca	214.441	0.9988	18.00
Cr	267.716	0.9999	2.88
Cd	317.933	0.9989	0.61
Co	228.615	0.9997	1.45
Cu	324.754	0.9998	0.64
Fe	238.204	0.9998	0.71
Pb	405.781	0.9997	8.63
K	766.491	0.9987	16.60
Mn	259.372	0.9999	0.28
Sr	407.711	0.9999	0.17
V	292.401	0.9998	18.00
Zn	206.200	0.9999	1.13

4.2. Kontrola točnosti

Kontrola točnosti mjerenja utvrđena je sa tri različita CRM-a. Elementni sastav za CRM kupusa (IAEA-359 *cabbage*) prikazan je u **Tablici 10.**, za CRM listova špinata (NIST SRM-1570a *Spinach Leaves*) u **Tablici 11.** i za CRM pšeničnog brašna (NIST SRM-1567a *Wheat Flour*) u **Tablici 12.**

Tablica 10. Elementni sastav CRM-a IAEA-356 Cabbage

Element	Certificirana vrijednost ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Mjerena vrijednost ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Analitički povrat (%)
Ba	11.00 ± 0.050	10.75 ± 0.045	98
Cd	0.120 ± 0.040	0.062 ± 0.039	52
Fe	148.0 ± 1.400	141.3 ± 1.325	95
Mg	2160 ± 0.100	1835 ± 0.150	85
Mn	31.90 ± 1.300	29.81 ± 1.230	93
Sr	49.20 ± 1.200	44.07 ± 1.130	90
Zn	38.60 ± 1.200	37.61 ± 1.225	97

Tablica 11. Elementni sastav CRM-a NIST SRM-1570a Spinach Leaves

Element	Certificirana vrijednost ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Mjerena vrijednost ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Analitički povrat (%)
B	37.70 ± 1.200	37.45 ± 0.900	99
Cd	2.876 ± 0.058	2.486 ± 0.040	86
Co	0.393 ± 0.030	0.212 ± 0.025	54
Cu	12.22 ± 0.860	12.58 ± 0.550	102
Mn	76.00 ± 1.200	68.66 ± 0.800	90
Sr	55.54 ± 0.500	47.92 ± 0.200	86
Zn	82.30 ± 3.900	72.31 ± 2.400	88

Tablica 12. Elementni sastav CRM-a NIST SRM-1567a Wheat Flour

Element	Certificirana vrijednost ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Mjerena vrijednost ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Analitički povrat (%)
Ca	191.0 ± 0.040	165.3 ± 0.050	87
Fe	14.10 ± 0.500	13.99 ± 0.400	99
Mn	9.400 ± 0.900	8.750 ± 0.700	93
K	1330 ± 0.300	1242 ± 0.200	93

Mjerene vrijednosti elementnog sastava certificiranog referentnog materijala dobro se podudaraju s certificiranim vrijednostima u sva tri materijala. Statistička usporedba dobivenih rezultata provedena je preko uparenog studentskog t-testa sa statističkom značajnosti od $P=0,05$. Izračunate t-vrijednosti 0,33 za IAEA-359 (*cabbage*), 0,08 za NIST SRM-1570a (*Spinach Leaves*) i 0,26 za NIST SRM-1567a (*Wheat Flour*) manje su od kritičnih vrijednosti 2,45, 2,45 odnosno 3,18. Test nije pokazao značajnu razliku između certificiranih i mjerenih vrijednosti.

4.3. Mjerni rezultati elementnih profila pripravaka ljekovitog bilja

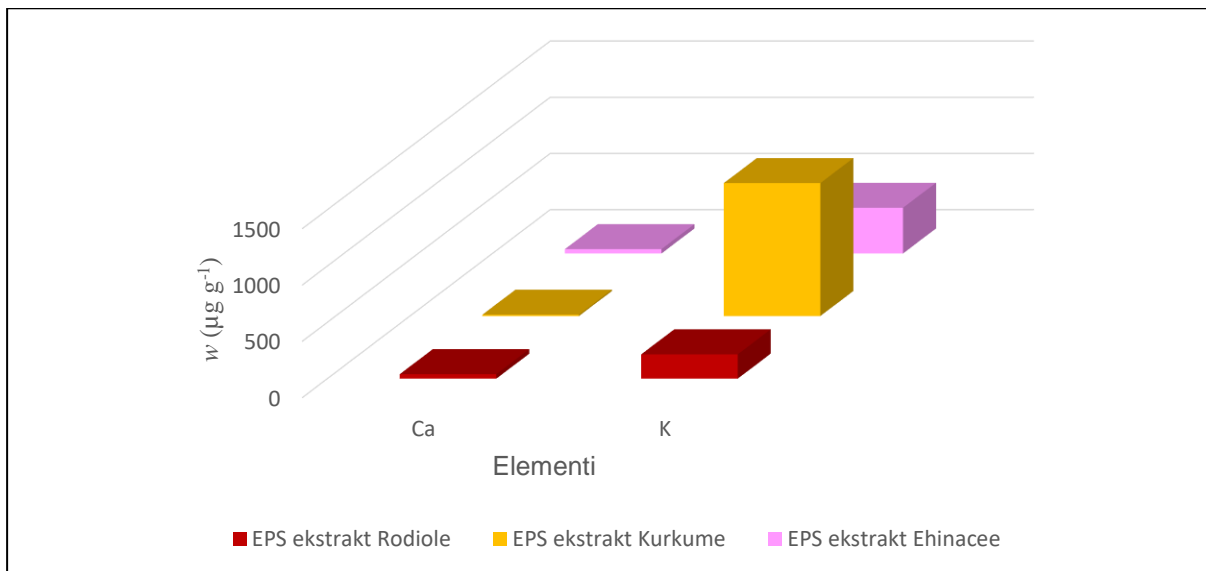
Koncentracija 14 elemenata (Ba, B, Cd, Ca, Cr, Co, Cu, Fe, Pb, Mn, K, Sr, V, Zn) u standardiziranim ekstraktima ljekovitog bilja (rodiola, kurkuma, ehinaceja) i tabletama na biljnoj bazi (guarana i rodiola) utvrđeni metodom ICP-OES nalaze se u **Tablici 13**.

Tablica 13. Koncentracije elemenata u EPS ekstraktima i tabletama na biljnoj bazi

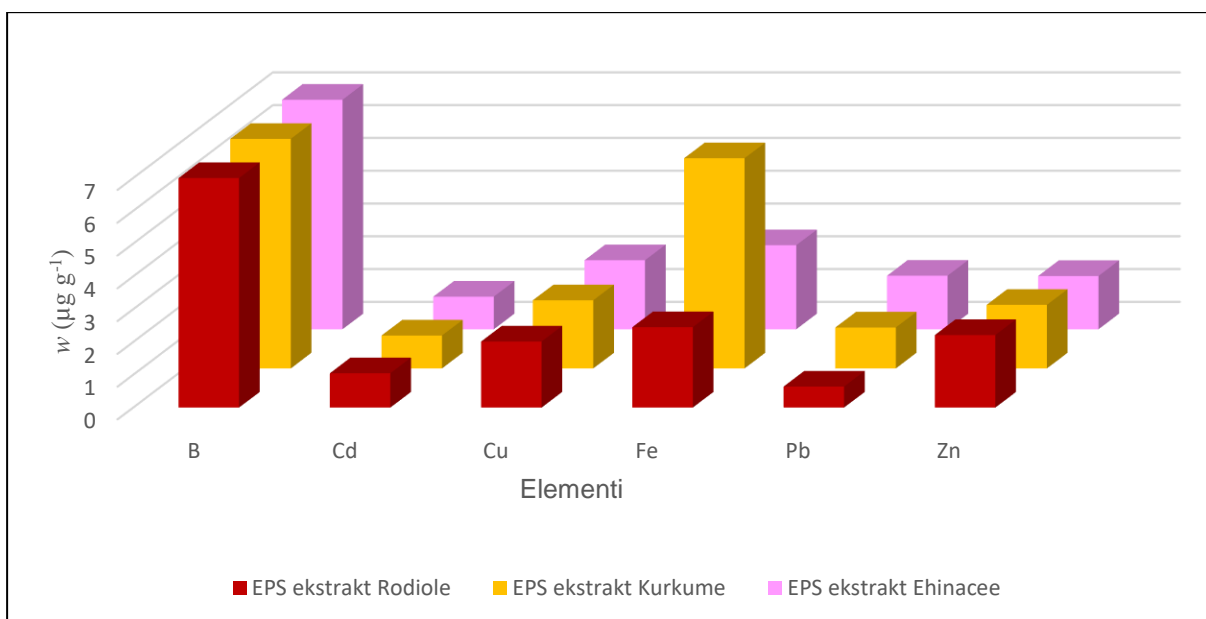
Element	EPS ekstrakt rodiole ($\mu\text{g g}^{-1}$)	EPS ekstrakt kurkume ($\mu\text{g g}^{-1}$)	EPS ekstrakt ehinaceje ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Tablete na bazi guarane i rodiole ($\mu\text{g g}^{-1}$)
Ba	0.229 ± 0.003	0.213 ± 0.005	0.207 ± 0.006	53.93 ± 1.400
B	7.000 ± 0.001	7.000 ± 0.001	7.000 ± 0.001	7.267 ± 0.054
Cd	1.047 ± 0.020	1.004 ± 0.030	0.994 ± 0.020	1.783 ± 0.027
Ca	39.69 ± 1.100	11.74 ± 0.900	38.48 ± 1.300	757.9 ± 6.800
Cr	0.019 ± 0.001	0.026 ± 0.004	0.022 ± 0.003	0.042 ± 0.001
Co	0.830 ± 0.004	0.863 ± 0.002	0.856 ± 0.005	1.384 ± 0.041
Cu	2.014 ± 0.061	2.077 ± 0.049	2.106 ± 0.039	5.555 ± 0.051
Fe	2.452 ± 0.024	6.410 ± 0.019	2.563 ± 0.024	43.58 ± 0.900
Pb	0.641 ± 0.004	1.248 ± 0.084	1.634 ± 0.076	19.55 ± 1.600
Mn	0.667 ± 0.005	0.777 ± 0.003	1.100 ± 0.020	14.56 ± 1.100
K	215.8 ± 0.040	1181 ± 6.600	405.7 ± 7.200	145.3 ± 1.300
Sr	0.315 ± 0.003	0.207 ± 0.007	0.255 ± 0.001	53.68 ± 0.800
V	0.021 ± 0.001	0.021 ± 0.002	0.022 ± 0.001	0.219 ± 0.006
Zn	2.213 ± 0.081	1.938 ± 0.071	1.625 ± 0.081	7.232 ± 0.041

4.3.1. Grafički prikaz mjernih rezultata ekstrakata EPS

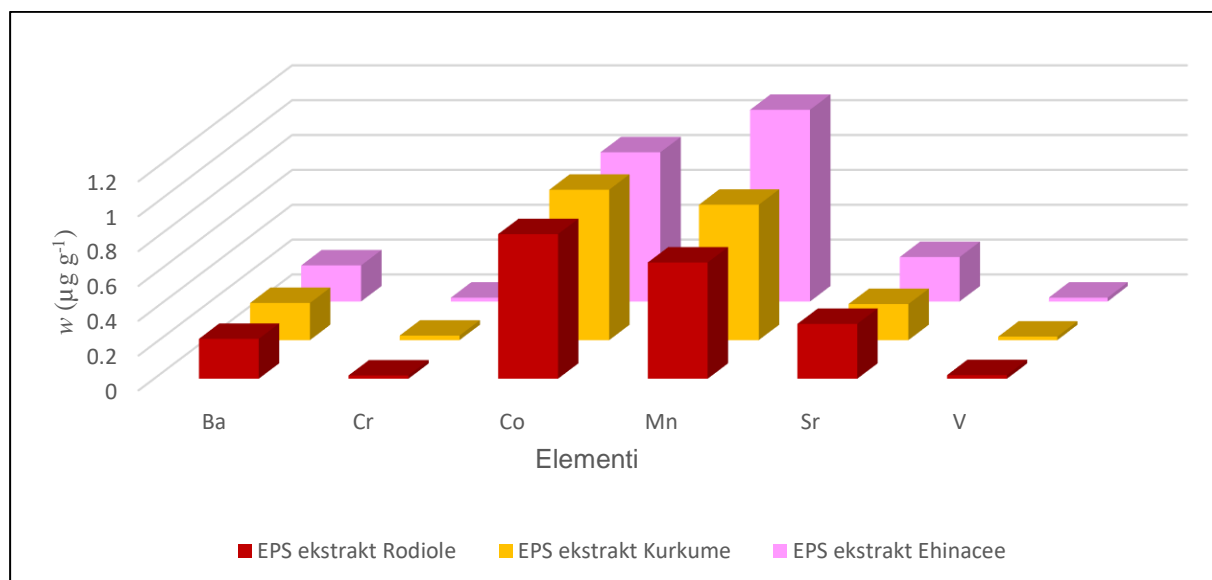
Grafički prikaz koncentracije elemenata analiziranih EPS ekstrakata podijeljeni je proizvoljno u tri skupine: elementi visoke (Slika 2.), srednje (Slika 3.) i niske (Slika 4.) koncentracije.



Slika 2. Grafički prikaz elemenata visoke koncentracije u EPS ekstraktima



Slika 3. Grafički prikaz elemenata srednje koncentracije u EPS ekstraktima



Slika 4. Grafički prikaz elemenata niske koncentracije u EPS ekstraktima

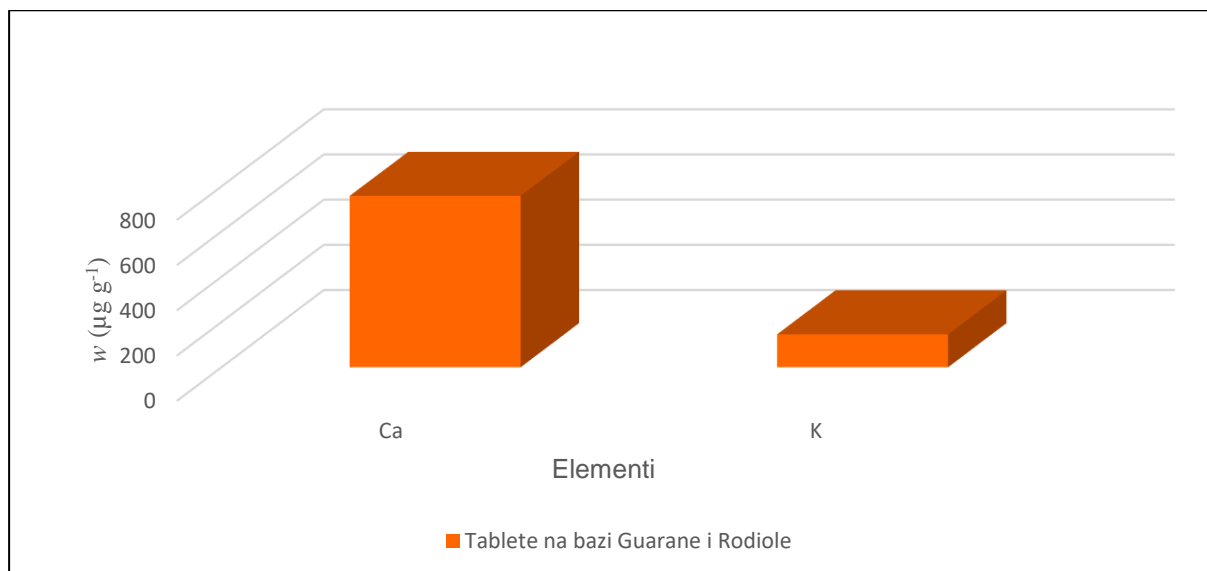
Analizom elemenata visoke koncentracije uočeni su koncentracijski rasponi za Ca 12 - 41 $\mu\text{g g}^{-1}$ i K 215 - 1181 $\mu\text{g g}^{-1}$. Koncentracija Ca je podjednak u sva tri uzorka EPS ekstrakata, dok je koncentracija K podjednaka u uzorcima EPS ekstrakata rodiole i ehinaceje, a povećana u EPS uzorku kurkume. Elementi srednje koncentracije (B, Cd, Cu, Fe, Zn) pokazuju uglavnom jednaku raspodjelu u sva tri uzorka osim Fe u uzorku EPS ekstrakta kurkume koji se nalazi u povećanoj koncentraciji te Pb čija koncentracija varira u sva tri uzorka. Elementi niske koncentracije (Ba, Cr, Co, Mn, Sr, V) pokazuju podjednaku raspodjelu u sva tri uzorka. Izuzev koncentracije Mn koji se nalazi u blago povećanoj koncentraciji u uzorku EPS ekstrakta ehinaceje. Koncentracije svih elemenata se nalaze iznad detekcijskih granica izuzev V čija koncentracija je vrlo blizu detekcijske granice.

Dobiveni rezultati su usporedivi s koncentracijskim raponima elemenata Fe, Zn, Cu i Mn dobivenim iz sadržaja običnih etanolnih ekstrakata drugih biljaka.³⁰

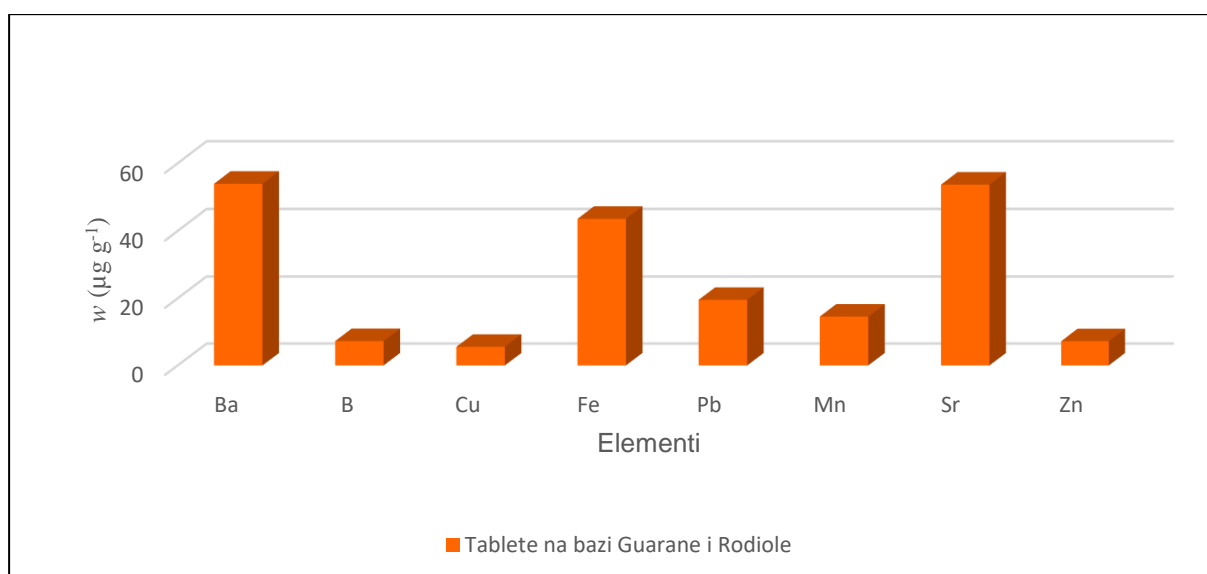
Nova istraživanja su pokazala da elementi kao B, Ca, Cd, Co, Cr, Fe, K, Mn, Mo, Pb i Zn definiraju takozvani „otisak prsta“ biljke. Sastav biljke na temelju navedenih elemenata može odrediti točnu regiju rasta biljke i njenu autentičnost za određeno područje.³¹

4.3.2. Grafički prikaz mjernih rezultata tableta na bazi guarane i rodiole

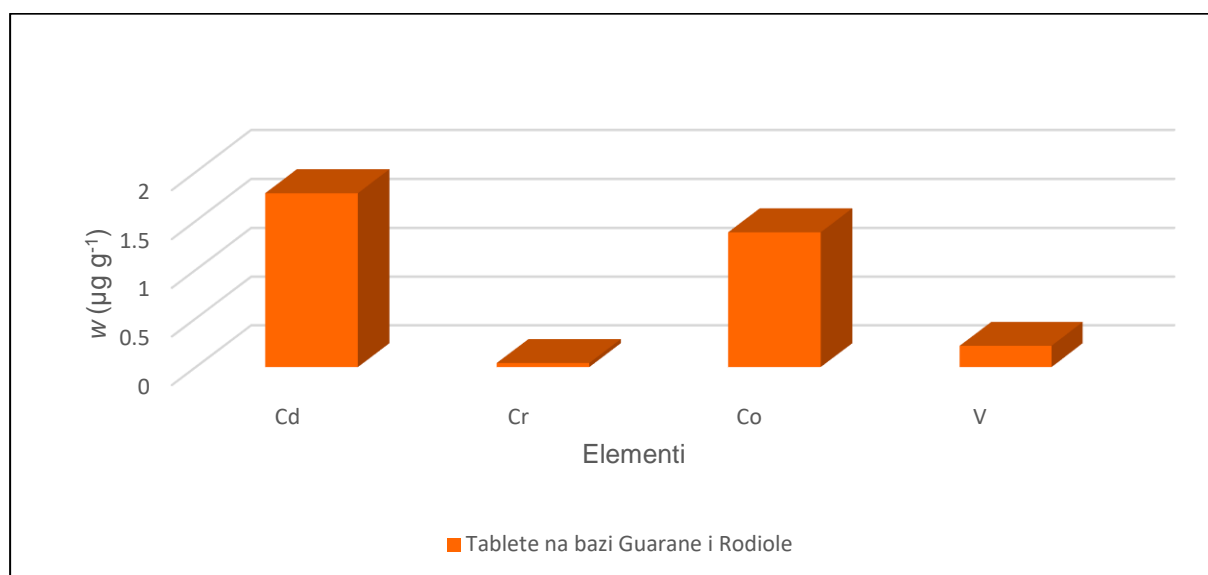
Grafički prikaz koncentracije elemenata analiziranih tableta na bazi guarane i rodiole podijeljeni je proizvoljno u tri skupine: elementi visoke (Slika 5.), srednje (Slika 6.) i niske (Slika 7.) koncentracije.



Slika 5. Grafički prikaz elemenata visoke koncentracije u tabletama na bazi guarane i rodiole



Slika 6. Grafički prikaz elemenata srednje koncentracije u tabletama na bazi guarane i rodiole



Slika 7. Grafički prikaz elemenata niske koncentracije u tabletama na bazi guarane i rodiole

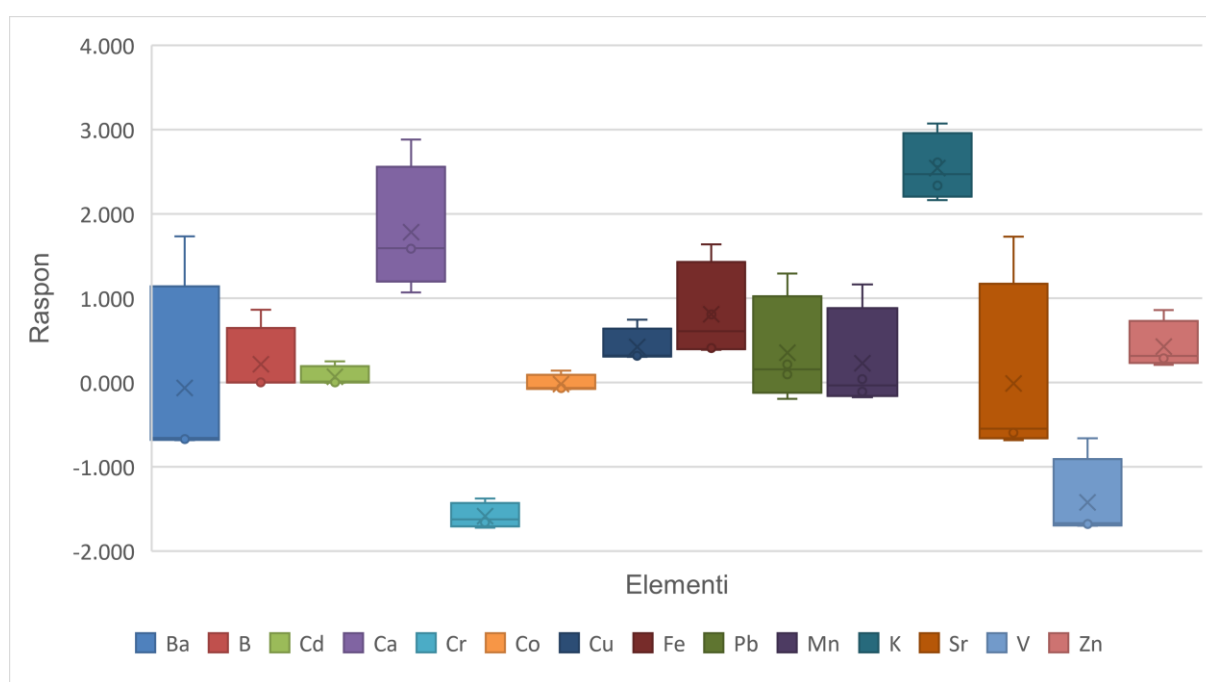
Analizom elemenata visoke koncentracije pokazano je da se Ca nalazi u najvećoj koncentraciji $787 \mu\text{g g}^{-1}$. Od elemenata srednje koncentracije najveće koncentracije pokazuju elementi Ba ($54 \mu\text{g g}^{-1}$) Fe ($44 \mu\text{g g}^{-1}$), Pb ($19 \mu\text{g g}^{-1}$) i Sr ($54 \mu\text{g g}^{-1}$). Najzastupljeniji elementi niske koncentracije su Cd ($1,8 \mu\text{g g}^{-1}$) i Co ($1,4 \mu\text{g g}^{-1}$).

U usporedbi s literaturnim podacima koncentracijskih vrijednosti navedenih elemenata u suhoj biljci guarane najviše odstupanje pokazuju elementi Pb i Cd s izmjerenim vrijednostima $19 \mu\text{g g}^{-1}$ i $1,8 \mu\text{g g}^{-1}$. Primjerice, Caldas et al. utvrdili su koncentracijske vrijednosti $< 2,0 \mu\text{g g}^{-1}$ za Pb te $< 0,2 \mu\text{g g}^{-1}$ za Cd u suhoj biljci guarane.²⁸

4.4. Kemometrijski rezultati

4.4.1. Univarijantna statistička analiza

Za bolje razumijevanje raspodjele elemenata u uzorcima pripravaka ljekovitog bilja koncentracijske vrijednosti elemenata su logaritmirane te je provedena univarijantna statistička analiza. Podatke prikazuje **Slika 8**. Pomoću metode dijagrama s pravokutnikom prikazane su pojedine varijable unutar skupa podataka distribucijskom analizom (box-whiskers), gdje je unutar svakog pravokutnika sadržana vrijednost medijana, prvi (Q1) i treći (Q3) kvartil te horizontalne linije koje predstavljaju donju i gornju granicu najmanjeg odnosno najvećeg podatka koji je unutar kvartilnog raspona.

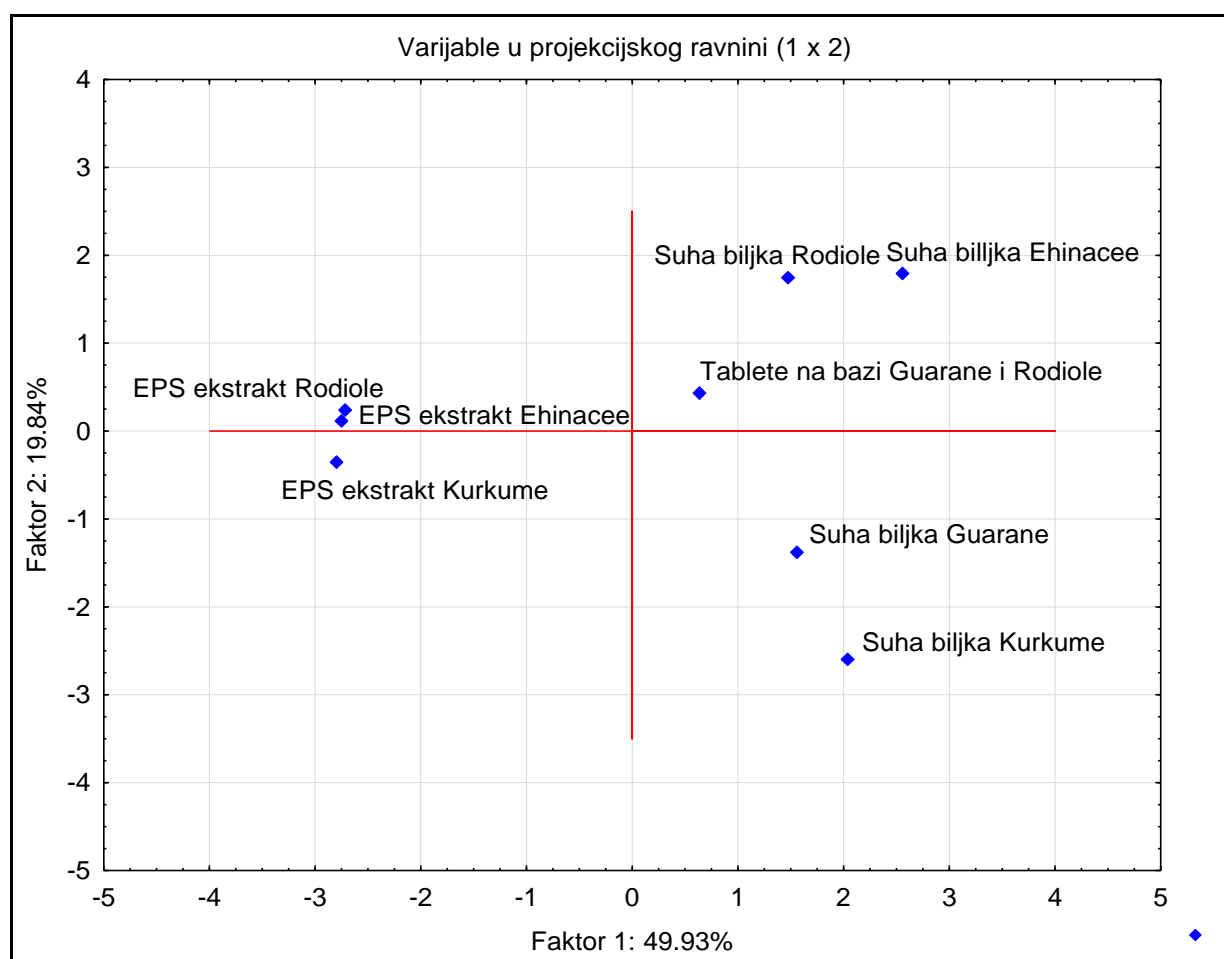


Slika 8. Distribucija koncentracija elemenata prikazana dijagramom s pravokutnicima

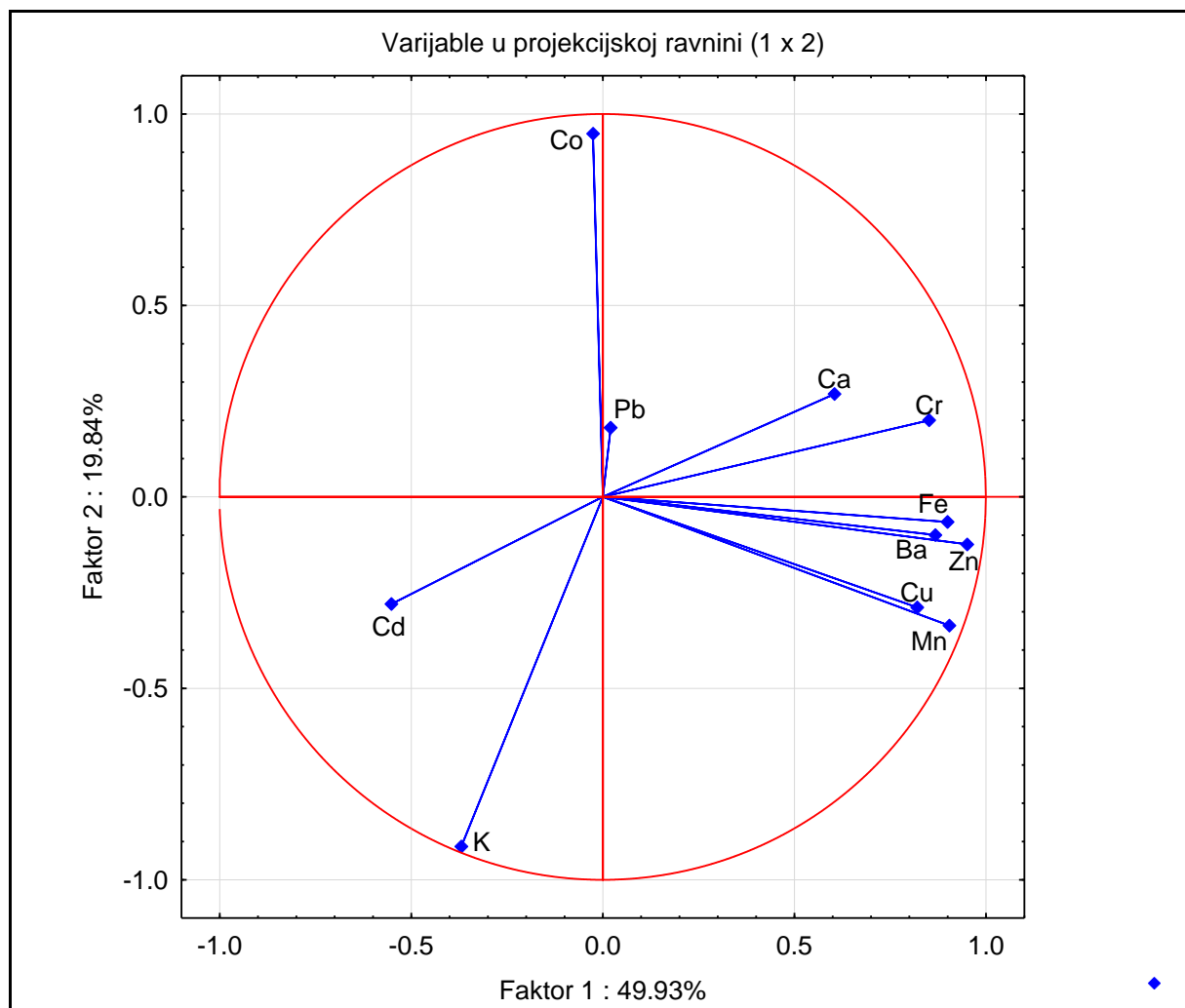
Iz dijagrama s pravokutnicima jasno je vidljiv elementni profil pripravaka ljekovitog bilja. Najzastupljeniji elementi su Ca i K, srednje zastupljeni su Ba, B, Cd, Cu, Fe, Pb, Mn, Sr i Zn, a elementi u tragovima su Cr i V. Stupanj asimetričnosti podataka najviše je vidljiv za elemente Ba, B, Fe, Sr i V. Ujednačenu raspodjelu imaju elementi Ca i K.

4.4.2. Multivarijantna analiza (PCA)

Multivarijantna analiza (PCA) provedena je na dobivenom skupu podataka te podacima iz znanstvene literature²⁷⁻³⁰ nakon prevođenja u logaritamske vrijednosti (7. Dodaci) u svrhu usporedbe koncentracijskih vrijednosti metala u pripravcima ljekovitog bilja i suhom biljnom materijalu. Korelacijska matrica u analizi je napravljena iz 11 stupaca koji predstavljaju varijable (elementi) i 8 redaka koji predstavljaju uzorke i uzorke iz literature. Analizom glavnih komponenti (PCA) utvrđeno je da prve četiri svojstvene vrijednosti (engl. *eigenvalues*) objašnjavaju 96 % ukupne varijance skupa podataka. Slika 9. prikazuje prve dvije glavne komponentne (PC1/PC2) koje objašnjavaju 69 % ukupne varijance. Slika 10. prikazuje faktorska opterećenja (engl. *loading*) analiziranih elemenata.



Slika 9. Klasifikacija uzoraka analizom glavnih komponenti (PCA), dijagram pogodaka u sustavu prve dvije glavne komponente PC1 i PC2



Slika 10. Faktorska opterećenja varijabli u sustavu PC1 / PC2

Grupiranje elemenata vidljivo je u 2 smjera, a uzoraka u 3 smjera. Analizom glavnih komponenti utvrđeno je svrstavanje elemenata duž osi prve i druge glavne komponente te da se skup podataka može podijeliti u dvije skupine. Prva skupina podataka duž pozitivne osi PC2 karakterizirana je opterećenjem za elemente: Ca i Cr. U tu skupinu spadaju uzorci suha biljka rodiole, suha biljka ehinaceje i tablete na bazi guarane i rodiole. Druga skupina duž negativne osi PC2 pokazuje opterećenje elemenata: Fe, Ba, Zn, Cu i Mn. U tu skupinu spada uzorak suha biljka guarane i suha biljka kurkume.

Rezultati eksperimenata pokazuju da će bolja klasifikacija i grupiranje skupina uzoraka biti moguća uz akumuliranje više mjernih podataka. Stoga se u narednim istraživanjima planira proširenje skupina uzoraka ovih biljaka u vidu ekstrakata i suhih pripravaka različitog porijekla. Uz to je bitno zadržati postojeće elemente kao varijable te po mogućnosti proširiti matricu s dodatnim elementima jer je iz gornjih prikaza vidljivo da na klasifikaciju utječu kako esencijalni elementi (Ca, K) tako i elementi u tragovima (Co, Pb, Cd)

§ 5. ZAKLJUČAK

Uspješno je utvrđen elementni sastav standardiziranih ekstrakata ljekovitog bilja (EPS) te dodataka prehrani izvedenih iz ljekovitih biljaka *Echinacea purpurea*, *Curcuma longa*, *Rhodiola rosea* i *Paullinia cupana* metodom atomske emisijske spektrometrije uz induktivno spregnutu plazmu (ICP-OES). Uzorci su pripremljeni mokrom razgradnjom potpomognutom mikrovalnim zračenjem u zatvorenom sustavu.

Odabrane su emisijske linije koje nemaju značajne interferencije. Linearnost linija bila je u zadovoljavajućem rasponu vrijednosti koeficijenata korelacije (0,9987-0,9999). Preciznost mjerenja postignuta je u rasponu od 0,1 do 2,5 % RSD. Kontrola točnosti utvrđena je s tri certificirana referentna materijala (kupus, listovi špinata i pšenično brašno) s vrijednostima analitičkog povrata u rasponu 52 – 98 %, 54 – 102 % i 87 – 93 %. Najmanji analitički povrat pokazao je Co. Razlog tome su moguće interferencije linija Co s linijama Fe u spektru. Statistički upareni Studentov t-test nije pokazao značajnu razliku između certificiranih i mjerenih vrijednosti.

Utvrđena je koncentracija 14 elemenata (Ba, B, Cd, Ca, Cr, Co, Cu, Fe, Pb, Mn, K Sr, V, Zn). Univarijantna statistička analiza pokazala je da su najzastupljeniji elementi Ca i K, srednje zastupljeni su Ba, B, Cd, Cu, Fe, Pb, Mn, Sr i Zn, a elementi u tragovima su Cr i V. Stupanj asimetričnosti podataka najviše je vidljiv za elemente Ba, B, Fe, Sr i V. Analizom glavnih komponenata (PCA) utvrđeno je da prve četiri svojstvene vrijednosti objašnjavaju 96 % ukupne varijance skupa podataka te da prve dvije glavne komponente (PC1/PC2) objašnjavaju 69 % ukupne varijance.

Iz dobivenih rezultata očito je da se bolja klasifikacija i grupiranje mogu postići uz akumuliranje više mjernih podataka. Potrebno je u narednim istraživanjima proširiti skupine uzoraka analiziranih biljaka u vidu ekstrakata i pripravaka različitog porijekla. Također, pokazano je da na klasifikaciju utječu kako esencijalni elementi (Ca, K) tako i elementi u tragovima (Co, Pb, Cd).

§ 6. LITERATURNI IZVORI

1. P.C. Nagajyoti, K.D. Lee, T.V.M. Sreekanth, Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review, *Environ. Chem. Lett.* **8** (2010) 199-216.
2. P. Konieczynski, A. Arceusz, M. Wesolowski, Essential elements and their relations to phenolic compounds in infusion of medicinal plants acquired from different European regions, *Biol. Trace Elem. Res.* **170** (2016) 466-475.
3. S. Rončević, L. Pitarević Svedružić, I. Nemet, Elemental Composition and Chemometric Characterization of Pyrethrum Plant Materials and Insecticidal Flower Extracts, *Anal. Lett.* **47** (2014) 627-640.
4. Definicija i opseg fitoterapije
<http://plantagea.hr/fitoterapija1/definicija-i-opseg-fitoterapije-2/>
(datum pristupa 26. srpnja 2017.)
5. Ekstrakti i iscrpine biljaka
<http://plantagea.hr/fitoterapija1/biljni-ekstrakti-2/ekstrakti-iscrpine-biljaka/>
(datum pristupa 26. srpnja 2017.)
6. Tinkture
<http://plantagea.hr/fitoterapija1/biljni-ekstrakti-2/ekstrakti-iscrpine-biljaka/tinkture/>
(datum pristupa 26. srpnja 2017.)
7. SIPF ekstrakti
<http://www.plantagea.hr/fitoterapija1/biljni-ekstrakti-2/ekstrakti-iscrpine-biljaka/sipf-ekstrakti/>
(datum pristupa 26. srpnja 2017.)
8. EPS fitostandardi
<http://plantagea.hr/fitoterapija1/biljni-ekstrakti-2/ekstrakti-iscrpine-biljaka/epsfitostandard-ekstrakti/>
(datum pristupa 26. srpnja 2017.)
9. IDCRA. International Conference on Drug Regulatory Authorities, World Health Organization, 1986.
10. N. Verma, Current regulatory challenged and approaches in the registration of herbal drugs in Europe, *Clinical Research and Regulatory Affairs*, **33** (2016) 9-24.

11. G. Benzi, A. Ceci, *Herbal Medicines in European Regulation*, *Pharmacol. Res.* **35** (1997) 355-362.
12. Važnije farmakopejske norme
<http://plantagea.hr/fitoterapija1/kontrola-kvalitete-2/vaznije-farmakopejske-norme/>
(preuzeto 27. srpnja 2017.)
13. A. P. Gupta, S. Gupta, *Elemental Profiling: Its Role and Regulations*, *Atomic Absorption Spectroscopy*, Dr. Muhammad Akhyar Farrukh (Ed.) ISBN: 978-953-307-817-5
14. H. Sarma, S. Deka, H. Deka, R.R. Saikia, Accumulation of Heavy Metals in Selected Medicinal Plants, *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* **214** (2011) 63-86.
15. P. W. J. M. Boumans, *Inductively Coupled Plasma Emission Spectroscopy*, Part 1, Wiley, New York, 1987.
16. S. Hill, *Inductively Coupled Plasma Spectrometry and Its Applications*, 2nd Edition, Blackwell Publishing Ltd, Oxford, 2007.
17. J. Nölte, *ICP Emission Spectrometry - A practical guide*, Wiley, Weinheim, 2003.
18. J. R. Dean, *Practical Inductively Coupled Plasma Spectroscopy*, Wiley, Newcastle, UK, 2005.
19. M. Thompo, J. N. Walsh, *A Handbook of Inductively Coupled Plasma Spectrometry*, Blackie, Glasgow and London, 1983.
20. M. Thompson, J. N. Walsh, *A Handbook of Inductively Coupled Plasma Spectrometry*, Blackie, Glasgow and London, 1983.
21. Z. Mester and R. Sturgeon, Sample Preparation for Trace Element Analysis (Comprehensive Analytical Chemistry Vol. 41), Elsevier, Montreal, 2003
22. M. Pecina, *Metode multivarijantne analize*, Interna skripta, Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet, Zagreb 2006.
23. J. N. Miller, J. C. Miller, *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*, 6th Edition, Pearson Educational Limited, 2010.
24. P. Koniectynski, A. Arceusz, M. Wesolowski, Essential Elements and Their Relations to Phenolic Compounds in Infusions of Medicinal Plants Acquired from Different European Regions, *Biol. Trace. Elem. Res.* **170** (2016) 466-475.

25. K. Pytlakowska, A. Kita, P. Janoska, M. Polowniak, V.Kozirk, Multi-element analysis of mineral and trace elements in medicinal herbs and their infusions, *Food chem.* **135** (2012) 494-501.
26. L. Reidy, K. Bu, M. Godfrey, J.V. Cizdziel, Elemental fingerprinting of soils using ICP-MS and multivariate statistics: A study for and by forensic chemistry majors, *Forensic Sci. Int.* Elsevier, **233** (2013) 37-44.
27. D. Pavlova, I.Karadjova, Toxic Element Profiles in Selected Medicinal Plants Growing on Serpentine in Bulgaria, *Biol. Trace Elem. Res.* **156** (2013) 288-297.
28. E.D. Caldas, L.L. Machado, Cadmium, mercury and lead in medicinal herbs in Brazil, *Food and Chem. Toxicol.* **42** (2004) 599-603
29. P. S. C. Silva, L. S. Francisconi, R. D. M. R. Gonçalves, Evaluation of Major and Trace Elements in Medicinal Plants, *J. Braz. Chem. Soc.* **27** (2016) 2273-2289.
30. S. Ražić, A. Onjia, B. Potkonjak, Trace elements analysis of Echinacea purpurea - herbal medicinal, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **33** (2003) 845-850.
31. X. Yuan, J. Shi, Y. Yang, J. Luan, J. Gao, Y. Wang, Establishment of Element Fingerprint and Multielement Analysis of Fritillaria thunbergii by Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry, *Biol. Trace Elem. Res.* **135** (2010) 304-313.

§ 7. DODATAK

Tablica 14. Logaritamske vrijednosti koncentracija elemenata u uzorcima

	Ba	Cd	Ca	Cr	Co	Cu	Fe	Pb	Mn	K	Zn
EPS rodiole	-0.640	0.019	1.598	-1.721	-0.081	0.304	0.389	-0.193	-0.175	2.334	0.344
EPS kurkume	-0.671	0.002	1.069	-1.585	-0.063	0.317	0.806	0.096	-0.109	3.072	0.287
EPS ehinaceje	-0.684	-0.002	1.585	-1.657	-0.067	0.323	0.408	0.213	0.041	2.608	0.210
Tablete Gua/Rod	1.731	0.251	2.879	-1.376	0.141	0.744	1.639	1.291	1.163	2.162	0.859
Biljka rodiole	0.858	-0.091	1.255	1.000	0.477	0.471	2.804	0.294	1.146	1.220	1.207
Biljka kurkume	1.301	-0.397	2.079	0.041	-0.721	0.853	2.514	-0.154	2.285	3.298	1.198
Biljka ehinaceje	0.734	-1.698	4.033	0.459	0.161	0.959	1.817	-0.221	1.190	1.220	1.037
Biljka guarane	0.858	-0.214	2.000	-0.301	-0.301	1.217	2.045	0.0791	1.220	2.792	1.320

Tablica 15. Svojstvene vrijednosti (Eigenvalues)

	Svojstvena vrijednost	Ukupna varijanca (%)	Kumulativna Svojstvena vrijednost	Ukupan %
1	5.492330	49.93028	5.49233	49.9303
2	2.182843	19.84402	7.67517	69.7743
3	1.796497	16.33179	9.47167	86.1061
4	1.168652	10.62411	10.64032	96.7302
5	0.265523	2.41385	10.90585	99.1440
6	0.078121	0.71019	10.98397	99.8542
7	0.016033	0.14576	11.00000	100.0000

§ 8. ŽIVOTOPIS

Osobni podatci

Ime i prezime: Bernardo Marcioš

Datum rođenja: 21. prosinca 1991.

Mjesto rođenja: Varaždin

Obrazovanje

1998–2006 I. osnovna škola, Varaždin

2006–2010 Medicinska škola, Varaždin

2010–2014 Preddiplomski studij kemije, Odijel za kemiju, Sveučilište J. J. Strossmayer, Osijek

Sudjelovanja u popularizaciji znanosti

2012 Festival znanosti

2013 Festival znanosti

2017 Otvoreni dani kemije

Sudjelovanja na znanstvenim skupovima

1. B. Marcioš, Z. Gale, I. Nemet, P. P. Štefanić, S. Rončević, *Analiza srebra metodom ICP-OES u klijancima duhana (Nicotiana tabacum) nakon izlaganja srebrovim nanočesticama*, 25. Hrvatski skup kemičara i kemijskih inženjera, Poreč, 2017, Knjiga sažetaka 19-22